

Bombas de expulsión como factores de virulencia y resistencia al tratamiento en *Mycobacterium tuberculosis*

Efflux pumps as virulence factors and resistance in
Mycobacterium tuberculosis treatment

Alejandro David Hernández-Herrera^a; David Pedroza-Escobar^a; Dealmy Delgadillo-Guzman^b; Marisela del Rocío González-Martínez^b; Julieta Luna-Herrera^c; Irais Castillo-Maldonado^a

^aCentro de Investigación Biomédica, Universidad Autónoma de Coahuila. Gregorio A. García 198 Centro, 27000 Torreón, Coahuila.

^bFacultad de Medicina, Universidad Autónoma de Coahuila. Av. Morelos 900-Oriente, Primero de Cobián Centro, 27000 Torreón, Coahuila.

^c Departamento de Inmunología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. Prolongación de Carpio y Plan de Ayala S/N, Casco de Santo Tomás, Azcapotzalco, 11340 Ciudad de México, CDMX.

Autor para correspondencia: Dra. Irais Castillo Maldonado
Centro de Investigación Biomédica
Universidad Autónoma de Coahuila
Email: irais.castillo@uadec.edu.mx
ORCID: 0000-0002-6689-0718

Resumen

La tuberculosis ocupa una de las principales causas de muerte por enfermedades infecciosas. Uno de los factores de la mortalidad es la falta de eficacia del tratamiento farmacológico, esto se debe principalmente a la resistencia generada por mutaciones en genes blancos que codifican proteínas de unión a los fármacos. Sin embargo, es imposible adjudicar totalmente la falla al tratamiento a estas mutaciones. Existen las proteínas de membrana conocidas como bombas de expulsión las cuales participan en este proceso de resistencia. En el presente trabajo se describen las 3 principales familias de bombas de expulsión involucradas en la resistencia a fármacos en tuberculosis. Este artículo hace énfasis en las principales bombas de expulsión relacionadas con la resistencia, así como la descripción de los mecanismos moleculares y bioquímicos de las bombas.

Palabras clave: Tuberculosis, bombas de expulsión, resistencia a fármacos.

Abstract

Tuberculosis is one of the leading causes of death from infectious diseases. One of the factors of mortality is the lack of efficacy of drug treatment, this is mainly due to resistance to mutations in target genes that encode drug binding proteins. However, it is impossible to fully attribute the failure of treatment to these mutations. There are membrane proteins known as efflux pumps which participate in this resistance process. In the present work we describe the 3 main families of efflux pumps involved in drug resistance in tuberculosis. This article emphasizes the main expulsion pumps related to resistance, as well as the description of the molecular and biochemical mechanisms of the pumps.

Keywords: Tuberculosis, efflux pumps, antimicrobial drug resistance

Introducción

La tuberculosis actualmente ocupa una de las 10 principales causas de muerte en el mundo. En el último reporte de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2021) se estimó que en el año 2020 hubo 5.8 millones de casos, mientras que la mortalidad para ese mismo año se estimó en 1.3 millones de casos en pacientes

negativos a virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y 214,000 muertes en pacientes con VIH, ocupando el primer lugar de las causas de muerte ocasionados por un solo agente infeccioso (WHO, 2021).

La Organización de las Naciones Unidas (ONU) estableció como objetivo la erradicación de la tuberculosis en un periodo que comprende del año 2016-2035, un 95% en reducción del número absoluto de muertes por tuberculosis, 90% de reducción en los casos incidentes y 0% de hogares afectados por costos excesivos debido a la tuberculosis (WHO, 2021). Sin embargo, existen diversos factores, tanto culturales, económicos y políticos que dan como resultado un panorama complicado para lograr tales objetivos, como es el incremento a la resistencia a fármacos contra tuberculosis. Por lo anterior, el objetivo de esta revisión fue describir la participación de las bombas de expulsión como factores de virulencia y resistencia al tratamiento en *Mycobacterium tuberculosis*.

Resistencia a fármacos contra tuberculosis

La resistencia a fármacos actualmente es un problema grave debido al limitado número de fármacos que son efectivos contra esta enfermedad, este problema se asocia a una alta morbilidad y mortalidad principalmente en países de bajos ingresos. Para el año 2017, se reportaron 580 000 casos en el mundo con el agente microbiano que presentaba resistencia a rifampicina y de estos casos un 82% fueron resistente a múltiples fármacos (Singh y col., 2020)

Mecanismos moleculares de resistencia a fármacos anti-tuberculosis

Existen mutaciones en genes que codifican para proteínas blanco de los fármacos anti-tuberculosis que generan resistencia al fármaco. (Anwaijriang y col., 2021). Una de las principales mutaciones debido a una sustitución es la que se localiza en la región ser315 del gen *katG*, el cual codifica para la enzima catalasa peroxidasa responsable de activar al pro-fármaco isoniacida. Esta mutación disminuye la actividad de la enzima en un 50% - 90% (Guo y col.,

2016). La rifampicina es uno de los fármacos de primera línea más efectivos contra tuberculosis (Zhang y col., 2019), por lo que la resistencia a este fármaco es un problema de salud a nivel mundial ya que implica el empleo de fármacos de segunda línea los cuales son menos eficaces, más costosos, con mayor toxicidad y además con un mayor tiempo de duración de tratamiento, complicando de esta forma la enfermedad (Kateete y col., 2019; Manjelievskaja y col., 2016; Oudghiri y col., 2018). La resistencia a rifampicina se debe principalmente a mutaciones del tipo sustitución, se localizan en las regiones S456, H451, D441 del gen *rpoB*, el cual codifica para la sub-unidad B de la RNA polimerasa (Benaissa y col., 2022). Estas mutaciones impiden la unión del fármaco a la enzima y la transcripción del RNA. La mutación en el gen *rpoB* explica del 80-95% de la resistencia a rifampicina (Abdelaal y col., 2009; Lahiri y col., 2016).

También se encuentra la resistencia intrínseca, que se caracteriza por el impedimento de la entrada del fármaco a la bacteria debido a la pared celular, la cual se conforma de múltiples capas que evitan la entrada tanto de fármacos hidrofóbicos como hidrófilos (Fonseca y col., 2015; Dookie y col., 2018;). Los fármacos que logran cruzar la membrana celular tienen que evitar un mecanismo de resistencia especializado en el cual la bacteria se vale de distintas estrategias como son: 1) la modificación del blanco del fármaco, reduciendo de esta forma la afinidad del fármaco hacia su blanco. 2) Otro mecanismo fascinante es el mimetismo o imitación de algunos blancos moleculares del fármaco, como lo que sucede con la expresión de la proteína MfpA la cual es semejante a la estructura en tercera dimensión del ADN, de esta forma los fármacos del tipo fluoroquinolonas se unen a esta proteína en lugar del sitio activo del ADN (Tao y col., 2013). 3) Otro mecanismo especializado es la modificación del fármaco por distintas enzimas de *M. tuberculosis* como la ocasionada por la enzima acetiltransferasa conocida como Eis la cual es capaz de acetilar distintos grupos de aminas de los fármacos del grupo de los aminoglucósidos empleados en la terapia de segunda línea (Tsodikov y col., 2014; Kumari y col., 2018), lo cual impide la unión del fármaco al ribosoma bacteriano.

Como se mencionó anteriormente, la resistencia a *M. tuberculosis* ocurre principalmente debido a mutaciones genómicas adquiridas espontáneamente, las cuales alteran el blanco del fármaco o las enzimas activadoras del profármaco (Palomino and Martin, 2014), posteriormente ocurre una selección de las cepas mutantes que son resistentes al fármaco que se genera debido al empleo de monoterapia, el uso de dosis bajas de antibiótico debido a una inadecuada prescripción, abandono de la terapia por parte del paciente, así como a la variabilidad farmacocinética (Srivastava y col., 2011). Sin embargo, estas mutaciones no explican el total de la resistencia a fármacos debido a que existen otros mecanismos intrínsecos de *M. tuberculosis* para generar resistencia. Uno de los principales es la presencia y participación de proteínas de membrana o también conocidas como bombas de expulsión, las cuales se encuentran agrupadas filogenéticamente en 5 súper familias: Cassete de unión a ATP, (~~ABC~~, ATP binding cassette, ABC), Superfamilia facilitadora principal (Major facilitator superfamily, MFS), división celular nodulación resistente (resistance nodulation cell division, RND), Familia Multi-fármaco Resistencia Pequeña (small multidrug resistance, SMR) y Familia de Expulsión de Compuestos Tóxicos y multi-fármacos (multidrug and toxic compound extrusion, MATE). En *M. tuberculosis* se presentan las primeras 4 familias mencionadas (Brake y col., 2017; Willers y col., 2017).

Una de las principales funciones de las bombas de expulsión es eliminar, sustancias químicas de la bacteria ya sean sustancias endógenas como exógenas, (Remm y col., 2022; Te Brake y col., 2022)

Sin embargo, estas bombas no solamente participan en la expulsión de sustancias, sino que además tienen participación en procesos bacterianos como: patogenicidad, e inmunidad en la defensa del organismo hospedero. En el presente trabajo se hace énfasis en los mecanismos de acción de los transportadores, así como de las características estructurales de tres de las principales familias (ABC, MFS y RND) implicadas en la resistencia a fármacos

contra *Mycobacterium tuberculosis* (Eduardo y col., 2011; Jaiswal y col., 2017; Kanji y col., 2018;).

Superfamilia de proteínas transportadoras ABC (ATP binding cassette)

Las proteínas de la familia ABC participan en distintas funciones celulares como: transporte de sustancias a través de la membrana, presentación de antígeno, desintoxicación celular y transporte de nutrientes a través de la célula. Estas proteínas se dividen en importadoras, encontradas casi exclusivamente en bacterias, y en exportadoras, las cuales están presentes en todos los organismos.

Las proteínas de expulsión de la superfamilia ABC se encuentran conformadas por dos dominios, un dominio transmembranal y un dominio citoplasmático de unión a nucleótidos (Xiong y col., 2015). Se ha propuesto que en los dominios membranales se encuentran los sitios de unión a sustratos, mientras que en los dominios de unión se lleva a cabo la hidrólisis de moléculas de ATP, lo cual permite obtener la energía necesaria para la expulsión de los diversos sustratos (Beis, 2015). Algunas de estas proteínas transportadoras se forman mediante la dimerización o fusión de dos transportadores segmentados a la mitad, un dominio membranal unido a un dominio de unión a nucleótido, formando una misma unidad funcional (Oswald y col., 2006). En la siguiente figura se muestra la estructura de la proteína P-gp, la cual posee los dominios transmembranales característicos de esta familia además de los dos dominios de unión a nucleótidos en la región citoplasmática.

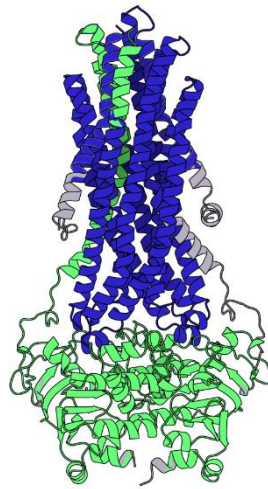


Figura 1. Proteína ABCB1 o P-gp. Miembro de la super-familia de bombas de expulsión ABC. De azul se muestran los dominios transmembranales, de verde se muestran los dominios de unión del ATP. **Fuente:** *Elaboración propia*

El “mecanismo de acceso alternado”, es el mecanismo de transporte propuesto para los transportadores de la familia ABC, en el cual se genera una dimerización entre los dos dominios de unión a nucleótidos cuando se une el ATP a los mismos, iniciando cambios conformacionales en los dominios transmembranales lo cual permite importar al sustrato hacia el citosol (Locher, 2016). Además, se propone que es la unión del ATP a su sitio respectivo el que genera los cambios conformacionales en el sitio de unión a sustrato. Sin embargo, esto sucede en los transportadores de tipo importador. El mecanismo para las proteínas exportadoras es aún más complejo. Se ha propuesto que los sustratos pueden acceder ya sea a partir del citosol o a través de la bicapa lipídica. A partir de este momento el transportador se encuentra en un estado “obstruido”, con las moléculas de ATP unidas a los dominios de unión a nucleótidos en forma “cerrada”. Posteriormente, los dominios transmembranales del transportador adoptan una forma abierta hacia afuera lo cual permite que el sustrato sea liberado hacia el exterior de la célula o hacia la capa externa de la bicapa lipídica. Finalmente, se lleva a cabo la hidrólisis del ATP lo cual permite que los dominios de unión a nucleótido se separen, provocando un cambio conformacional de las hélices transmembranales pasando de una posición abierta hacia el exterior a una conformación orientada hacia adentro (Locher, 2016).

Participación de los transportadores ABC en *Mycobacterium tuberculosis*.

Con respecto a la participación o actividad fisiológica de las proteínas de esta superfamilia (ABC) en *Mycobacterium tuberculosis*, se ha demostrado que el 2.5% del genoma de *M. tuberculosis* contiene genes que codifican para proteínas ABC (Kanji y col., 2019). A continuación, se describen algunos estudios *in vitro* donde se demuestra algunas proteínas relevantes de esta superfamilia relacionadas con la resistencia a fármacos.

En un estudio se demostró mediante un sistema de expresión simultáneo, la participación de las proteínas DrrA y DrrB en el modelo de *M. smegmatis* como exportadora de fármacos hidrofóbicos. Además, en este estudio utilizaron reserpina y verapamilo como inhibidores de proteínas ABC, los cuales fueron capaces de revertir la resistencia a los fármacos daunorrubicina, doxorubicina, cloranfenicol, eritromicina, norfloxacino, estreptomina y tetraciclina. De esta forma, se caracterizó experimentalmente que ambas proteínas actúan en conjunto en la resistencia a fármacos (Choudhuri y col., 2002).

Pasca y col. (2004) comprobaron que los genes Rv2686c-Rv2687c-Rv2688c conforman un operón que codifica una proteína de la familia ABC, aunado a esto se demostró en el modelo de *M. smegmatis* transformada con este gen completo que era capaz de generar resistencia a los fármacos ciprofloxacino, norfloxacino, moxifloxacino y esparfloxacino. Para determinar que la resistencia era generada por esta bomba, posteriormente se emplearon inhibidores de las bombas ABC; reserpina, verapamilo y cianuro de carbonilo m-clorofenil hidrazona, los cuales lograron revertir la resistencia a ciprofloxacino a niveles similares al de la cepa control transformada únicamente con el plásmido.

Otra proteína de la familia ABC relacionada con la resistencia a fármacos en *M. tuberculosis* es Rv1218c, la cual se demostró su participación en la resistencia a diversas sustancias químicas como pirazolonas, piridonas, biaril piperazinas, bisalino piranomidinas, pirroles y novoviocina mediante un estudio *in vitro* empleando la cepa *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 y su mutante sin

expresión del gen Rv1218c (Balganesh y col., 2010). Además, Wang y col., (2013) demostraron que la proteína codificada por el gen Rv1217c–Rv1218c, se encontraba sobreexpresada en muestras clínicas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes con esta enfermedad y se encontraba relacionada con la resistencia en las mismas muestras a los fármacos de primera línea rifampicina e isoniacida.

En el estudio realizado por Hao y col. (2011) se descubrió que el operón conformado por los genes Rv1456c-Rv1457c-Rv1458c, se encontraba sobreexpresado el RNA mensajero en muestras clínicas de *M. tuberculosis*, las cuales eran resistentes a cuando menos a uno de los cuatro fármacos de primera línea: rifampicina, isoniacida, estreptomycin y etambutol, relacionándose esta sobreexpresión en muestras clínicas con múltiple resistencia a fármacos en mayor frecuencia a comparación de las mono-resistentes. Shrivastava y col. (2017) propusieron a este gen como un marcador diagnóstico para diferenciar las especies del complejo de las micobacterias no tuberculosas.

La proteína Rv2477c, la cual se compone de dominios de unión a nucleótidos ordenados en tándem y no presenta dominios transmembranales a diferencia de todas las proteínas ABC mencionadas anteriormente. Esta proteína se ha implicado en diversos procesos como transducción de proteínas, resistencia a antibióticos y crecimiento celular. En el estudio realizado por Daniel y col. (2017), en donde aisló y caracterizó bioquímicamente a esta proteína, se reportó que presenta una actividad ATPasa, y que además, la sustitución de los aminoácidos glutamato por glutamina en los residuos 185 y 468 en el motivo Walker B eran capaces de inhibir la actividad ATPasa. También se demostró que los antibióticos tetraciclina y eritromicina inhibieron la actividad ATPasa por lo cual proponen en el mismo reporte que esta proteína se encuentra relacionada con la traducción de proteínas y la resistencia a tetraciclinas y macrólidos. Otra de las proteínas que se ha asociado en la patogenicidad es la proteína codificada por el gen Rv1747, la cual pertenece a la superfamilia de proteínas ABC y participa en la exportación de lipooligosacaridos. En estudios por analogía bioquímica y estructural se planteó que la proteína PknF codificada por el gen Rv1747,

participa en la transducción de señales de *Mycobacterium tuberculosis*, esto lo hace mediante fosforilación reversible de proteínas, una actividad cinasa de serina/treonina (Spivey y col. 2011), se demostró que mutaciones en aminoácidos implicados en esta actividad, generaban una disminución en la carga bacteriana en pulmones y baso de ratones, a comparación de los ratones que poseían la cepa salvaje de *Mycobacterium tuberculosis* (Curry y col., 2005).

Proteínas transportadoras MFS (Superfamilia Facilitadora Principal)

La familia de proteínas transportadoras MFS es la más grande de los transportadores secundarios, mediante estudios filogenéticos de especificidad de sustrato y de mecanismos de acción, se estimó que se conforma de 76 sub-familias capaces de transportar diversos tipos de sustratos, como péptidos, carbohidratos, lípidos, aminoácidos, nucleósidos, iones y moléculas pequeñas de estructura variable (Pasqua y col., 2019). Las proteínas pertenecientes a esta súper familia pueden funcionar como simportadores, antiportadores y algunos casos como uniportadores (Forrest y col., 2011). Una de las características que los definen como transportadores secundarios es que utilizan el potencial electroquímico, generado por un gradiente de iones en la fuerza motriz de protones (Quistgaard y col., 2016).

Estructura de los transportadores de la súper familia MFS

Los transportadores de esta familia se caracterizan por poseer doce hélices α transmembranales organizadas en dos dominios, el dominio-N (TM1-TM6) y el dominio-C agrupado en una pseudo-simetría doble separado por una cavidad interna, esta cavidad se ha descrito como una vía para la traslocación del sustrato, mediante las hélices transmembranales 1, 4, 7 y 10 se transloca el sustrato, y las hélices 2, 5, 8 y 11 son las que generan la interacción entre los dos dominios, existe un tercer grupo de hélices transmembranales (3, 6, 9 y 12) las cuales participan en las interacciones hidrofóbicas con la bicapa de lípidos, y se ha propuesto que son unas hélices de soporte (Zhan y col., 2015). En la siguiente figura se muestra la proteína GLUT1 de la familia MFS, esta proteína

es fundamental para que diversos tejidos, así como la barrera hematoencefalica y los eritrocitos, puedan captar la glucosa para obtener energía, y evitar que se incremente en el torrente sanguíneo.

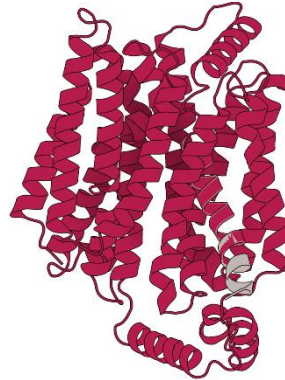


Figura 2. Transportador GLUT1. Pertenece a la familia de las proteínas MFS, participa en la captación de glucosa en distintos tejidos mediante una difusión facilitada.

Fuente: *Elaboración propia*

Mecanismo de transporte de las proteínas de la familia MFS

Se ha propuesto que los transportadores de ésta familia pueden organizarse de forma general en tres estados conformacionales, uno abierto hacia el interior de la célula, otro hacia el exterior y un tercer estado obstruido. Basado en esto, se han propuesto dos modelos, el modelo “rocker-switch”, el cual se genera cuando el dominio N y el dominio C adoptan las conformaciones abierto hacia afuera y abierto hacia adentro de forma alterna a través de un eje de rotación en el cual se encuentra el sitio de unión al sustrato en la región de la interfase de ambos dominios (Yan 2015; Drew y col., 2021). El otro modelo es el conocido “clamp and switch model” en el cual se toma en cuenta el estado conformacional ocluido, en el cual tanto el estado abierto hacia afuera como el abierto hacia adentro se encuentran parcialmente ocluidos. Proponiéndose que la oclusión en el estado abierto hacia adentro se genera debido al doblamiento de las regiones citoplásmicas finales de las hélices 4 o 10, mientras que la oclusión del estado abierto hacia afuera es debido al doblamiento de las hélices transmembranales 1 y/o 7 (Quistgaard y col., 2016).

Participación de los transportadores MFS en *Mycobacterium tuberculosis*.

En *Mycobacterium tuberculosis* se han identificado 9 subfamilias de MFS: la familia transportadora de azúcar, la familia sialato protón H⁺ simportadora, la familia simportadora anión-catión, la familia antiportadora-1 fármaco protón, la familia UMF1, la familia antiportadora-2 fármaco protón, la familia UMF10, la familia simportadora metabolito-protón y la familia transportadora nitrato-nitrito (Ping y col., 2017). La participación de estas proteínas transportadoras en *Mycobacterium tuberculosis*, implica la resistencia a algunos de los fármacos empleados para tratar la tuberculosis. A continuación, se describen algunos estudios tanto *in vitro* como epidemiológicos, en donde se han demostrado la relación de estas bombas con la resistencia a fármacos contra tuberculosis. En un estudio experimental donde se clonó el gen de la proteína LfrA se demostró que actuaba como bomba de expulsión y que generaba resistencia en fármacos de tipo fluoroquinolona como norfloxacin (Liu y col., 1996). Otro estudio experimental se determinó que la exposición del fármaco isoniacida inducía la sobre expresión de la proteína EfpA codificada por el gen Rv2846c. Posteriormente se determinó que en muestras de *Mycobacterium tuberculosis* multidrogoresistentes aisladas de pacientes, presentaban una sobre-expresión promedio del gen que expresa esta proteína (Machado y col., 2017; Sowajassatakul y col., 2018)

Otra proteína implicada en la resistencia a fármacos es P55 la cual mediante diversos estudios experimentales se demostró que participa en la resistencia a rifampicina y a clofazimina mediante un mecanismo de expulsión usando el gradiente electroquímico de la fuerza motriz de protones como fuente de energía (Farrow and Rubin, 2008).

La proteína Tap participa en *M. tuberculosis* como un transportador de membrana, la cual es codificada por el gen Rv1258c. (Aínsa y col., 1998) caracterizaron *in vitro* a este gen, se demostró que era capaz de generar resistencia a diversos fármacos como tetraciclina y gentamicina y que esta resistencia se veía disminuida cuando se empleaban el inhibidor CCCP. Posteriormente empleando el modelo de *Mycobacterium bovis* BCG, se identificó

que ésta proteína participaba en la expulsión de distintos fármacos como tetraciclina, etambutol, rifampicina e isoniacida, también se demostró que participaba en cambios morfológicos y en una pérdida de la viabilidad de la micobacteria (Ramón-García y col., 2009). En un estudio experimental empleando *Mycobacterium marinum* se demostró que Rv1258c tenía participación en la generación de la tolerancia a fármacos dentro de los macrófagos en una etapa temprana después de la infección al macrófago (Adams y col., 2011). La caracterización del gen Rv2459 fue llevada a cabo en 2010, se encontró que este gen codificaba a la bomba de expulsión nombrada *jefA*, en este estudio se demostró que las mutantes de *Mycobacterium tuberculosis* que sobre-expresaban la proteína mencionada tenían niveles de resistencia para etambutol, isoniacida y estreptomicina de 8, 64 y 16 veces (Gupta y col., 2010). Rv0191 es uno de los transportadores de la familia MFS caracterizados recientemente como un transportador funcional que participa en la resistencia a fármacos del género micobacteria, además se demostró en este estudio que la sobre regulación de este gen dependía de las concentraciones del fármaco cloranfenicol, mecanismo en el cual participa la proteína factor de transcripción Rv1353c como un regulador de la región promotora del gen (Li y col., 2019).

En otro estudio experimental empleando la cepa *Mycobacterium tuberculosis H37a* se determinó que el ácido pirazinoico el cual se emplea como fármaco contra tuberculosis, se unía a la proteína Rv0191, además de que los niveles de esta proteína se encontraban sobre-expresados causando una resistencia leve a este fármaco (Zhang y col., 2017). Estos estudios *in vitro* confirman lo que se había encontrado en cepas aisladas de pacientes con tuberculosis mono resistentes a rifampicina, en 4 de las cuales se encontraba sobre expresado este gen (Li y col., 2015).

Participación de las bombas de expulsión en la virulencia de *Mycobacterium tuberculosis*; un caso especial de la familia MmpL perteneciente a la superfamilia RND

Las proteínas de la familia MmpL pertenecen a la superfamilia de proteínas RND y se encuentran 13 genes que codifican a proteínas de la familia MmpL en el genoma de *Mycobacterium tuberculosis* (Domenech y col., 2005). Estructuralmente las proteínas de esta superfamilia se conforman de 10 a 12 dominios transmembranales. Esta familia de proteínas tiene una participación importante en el ensamblaje de la pared celular de *Mycobacterium tuberculosis* ya que es responsable de la translocación de lípidos desde el citoplasma hacia el espacio periplasmático en donde posteriormente van a ser llevados hacia la pared celular (Ma y col., 2020) algunos de estos lípidos por ejemplo trealosa monomicolato se encuentran implicados en la formación del granuloma y en la supervivencia intracelular de la bacteria (Chalut, 2016; Purdy, 2019).

En la siguiente figura se muestran las principales proteínas de la familia MmpL que participan en la resistencia y virulencia en *Mycobacterium tuberculosis*.

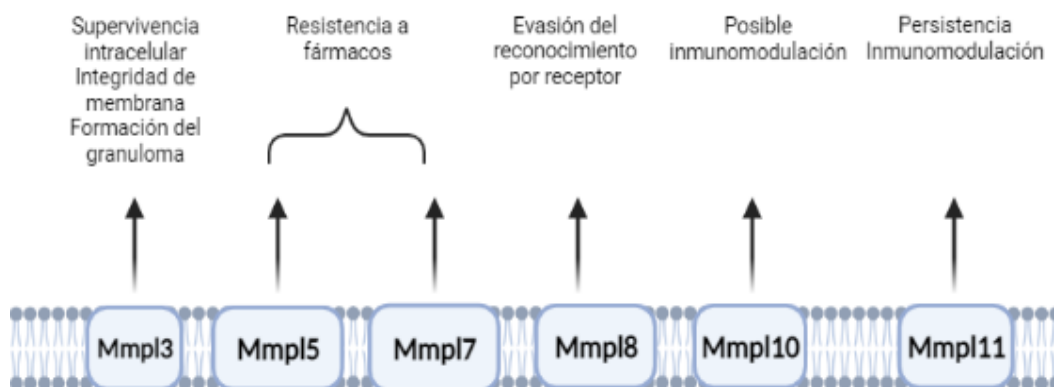


Figura 3. En esta figura se muestran las principales bombas de expulsión de la sub-familia MmpL, que participan tanto en la resistencia a fármacos como en la virulencia de *Mycobacterium tuberculosis*. **Fuente:** Elaboración propia

Mmpl3

Se ha determinado que esta proteína es fundamental para la viabilidad de *Mycobacterium tuberculosis* y que la delección del gen de ésta proteína lleva a la muerte de la bacteria, por lo tanto, éste gen es esencial para *Mycobacterium tuberculosis*. Mmpl3 participa en la translocación de trealosa monomicolato el cual es una molécula precursora de trealosa dimicolato que es fundamental en

la biosíntesis de la pared celular de *Mycobacterium tuberculosis*. La función de Mmp13 se ha propuesto como una proteína blanco importante para eliminar a la bacteria (Degiacomi y col., 2017). Mediante el análisis de la estructura cristalizada de esta proteína se definió que se conforma de doce hélices α transmembranales, en donde se encuentran las hélices α IV y X se determinó que las hélices conforman la región central del dominio transmembranal y en ésta zona se encuentran dos pares de aminoácidos (ácido aspártico y tirosina) los cuales tienen una participación en la translocación de protones fundamentales para la función de la proteína. En la siguiente figura se muestra la estructura de la proteína Mmp13 así como los dos pares de aminoácidos que participan en la translocación de protones para la generación de energía, como se comentó más arriba esta zona es un blanco importante para inhibir la función de la proteína, lo cual afecta severamente la viabilidad del bacilo.

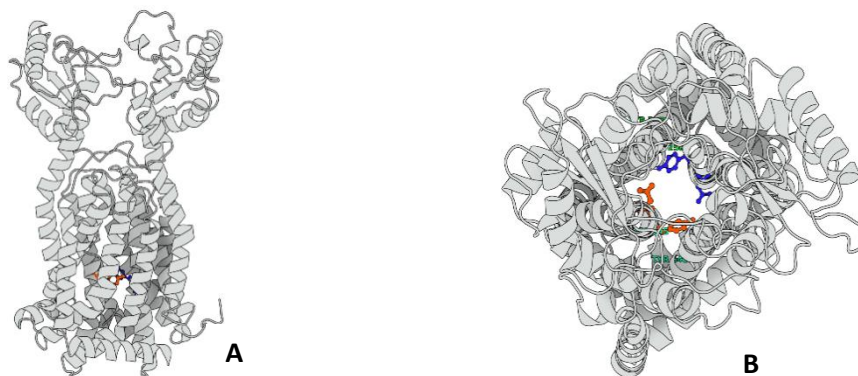


Figura 4. Proteína Mmp13. Esta proteína participa en el transporte de ácidos micólicos desde el citosol hacia la envoltura celular. En el inciso B se muestra de forma transversal los dos pares de aminoácidos aspartato-tirosina importantes para la translocación de protones y generación de energía. **Fuente:** *Elaboración propia*

Los autores describieron el posible mecanismo de inhibición de la proteína mmp13, el cual consiste en el bloqueo de la interacción entre el par de aminoácidos aspartato-tirosina localizados en las hélices transmembranales IV y X, lo cual conlleva a interrumpir la translocación de protones, necesaria para la

generación de la energía de la misma proteína, impidiendo de esta forma la translocación de moléculas de la membrana de *Mycobacterium tuberculosis* fundamentales para la formación de la misma (Zhang y col., 2019). Este estudio corrobora y elucida los mecanismos de acción de los hallazgos realizados por diversos autores, en los cuales también proponen a mmp13 como un blanco importante contra *Mycobacterium tuberculosis*. Como ejemplo el estudio realizado por (Kozikowski y col., 2017) en el que emplearon una serie de compuestos del tipo indol-carboxamidas, los cuales fueron capaces de inhibir la translocación de trealosa monomicolato, impidiendo de esta forma la formación de trealosa dimicolato. Posteriormente (Xu y col., 2017) demostraron que la molécula BM212 del tipo diaril-pirrol era capaz de inhibir la translocación de trealosa monomicolato, además describieron que Mmp13 funciona como una flipasa y no como un exportador, lo cual aumenta la variabilidad de la función de las proteínas de la familia RND relacionada con la particularidad estructural de esta proteína ya que presenta diferencias estructurales únicas a diferencia de la mayoría de las proteínas pertenecientes a la propia familia, como es la formación de un estado de oligomerización y la particularidad de los dominios periplasmáticos los cuales son mucho más pequeños y el dominio citoplasmático es más grande (Su y col., 2019).

Conclusión.

Se concluye que la participación de las bombas de expulsión en conjunto con mutaciones de genes de resistencia es una causa importante de la resistencia a fármacos. Mediante estudios *in vitro* y con aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* se determinó que la presión con dosis sub inhibitorias de fármacos eran un factor importante para inducir la sobreexpresión de diversas bombas de expulsión generando resistencia a fármacos contra tuberculosis. Por esto es necesario y urgente continuar con la investigación de las bombas de expulsión que nos permita entender el comportamiento de estas proteínas para desarrollar nuevos fármacos con la capacidad de inhibir a las mismas y mejorar la respuesta

al tratamiento farmacológico, así como la disminución de la patogenicidad del bacilo causante de la tuberculosis.

Agradecimientos:

Al apoyo para la integración de nuevo profesor de tiempo completo (NPTC) “Programa para el desarrollo profesional docente, tipo superior -SEP” con folio: UACOA-PTC-488.

Bibliografía

- Abdelaal, A., El-Ghaffar, H. A., Zaghoul, M. H., El Mashad, N., Badran, E., & Fathy, A. (2009). Genotypic detection of rifampicin and isoniazid resistant Mycobacterium tuberculosis strains by DNA sequencing: a randomized trial. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 8, 4. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-8-4>
- Adams, K. N., Takaki, K., Connolly, L. E., Wiedenhof, H., Winglee, K., Humbert, O., Edelstein, P. H., Cosma, C. L., & Ramakrishnan, L. (2011). Drug tolerance in replicating mycobacteria mediated by a macrophage-induced efflux mechanism. *Cell*, 145(1), 39–53. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.022>
- Adams, K. N., Takaki, K., Connolly, L. E., Wiedenhof, H., Winglee, K., Humbert, O., Edelstein, P. H., Cosma, C. L., & Ramakrishnan, L. (2011b). Drug tolerance in replicating mycobacteria mediated by a macrophage-induced efflux mechanism. *Cell*, 145(1), 39–53. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.022>
- Aínsa, J. A., Blokpoel, M. C. J., Otal, I., Young, D. B., De Smet, K. A. L., & Martín, C. (1998a). Molecular cloning and characterization of Tap, a putative multidrug efflux pump present in Mycobacterium fortuitum and Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Bacteriology*, 180(22), 5836–5843.
- Aínsa, J. A., Blokpoel, M. C., Otal, I., Young, D. B., De Smet, K. A., & Martín, C. (1998b). Molecular cloning and characterization of Tap, a putative multidrug efflux pump present in Mycobacterium fortuitum and Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Bacteriology*, 180(22), 5836–5843. <https://doi.org/10.1128/JB.180.22.5836-5843.1998>
- Anwaierjiang, A., Wang, Q., Liu, H., Yin, C., Xu, M., Li, M., Liu, M., Liu, Y., Zhao, X., Liu, J., Li, G., Mijiti, X., & Wan, K. (2021). Prevalence and Molecular Characteristics Based on Whole Genome Sequencing of Mycobacterium tuberculosis Resistant to Four Anti-Tuberculosis Drugs from Southern Xinjiang, China. *Infection and Drug Resistance*, 14, 3379–3391. <https://doi.org/10.2147/IDR.S320024>
- Balganesh, M., Kuruppath, S., Marcel, N., Sharma, S., Nair, A., & Sharma, U. (2010). Rv1218c, an ABC transporter of Mycobacterium tuberculosis with implications in drug discovery. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(12), 5167–5172. <https://doi.org/10.1128/AAC.00610-10>

- Beis, K. (2015). Structural basis for the mechanism of ABC transporters. *Biochemical Society Transactions*, 43(5), 889–893. <https://doi.org/10.1042/BST20150047>
- Benaissa, E., Benlahlou, Y., Bssaibis, F., Maleb, A., & Elouennass, M. (2022). Evaluation of a Molecular Test for Detection of Mycobacterium tuberculosis Isolates Resistant to Rifampicin and Isoniazid. *Clinical Laboratory*, 68(3). <https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2021.210614>
- Chalut, C. (2016). MmpL transporter-mediated export of cell-wall associated lipids and siderophores in mycobacteria. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 100, 32–45. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2016.06.004>
- Choudhuri, B. S., Bhakta, S., Barik, R., Basu, J., Kundu, M., & Chakrabarti, P. (2002). Overexpression and functional characterization of an ABC (ATP-binding cassette) transporter encoded by the genes *drxA* and *drxB* of Mycobacterium tuberculosis. *The Biochemical journal*, 367(Pt 1), 279–285. <https://doi.org/10.1042/BJ20020615>
- Curry, J. M., Whalan, R., Hunt, D. M., Gohil, K., Strom, M., Rickman, L., Colston, M. J., Smerdon, S. J., & Buxton, R. S. (2005). An ABC transporter containing a forkhead-associated domain interacts with a serine-threonine protein kinase and is required for growth of Mycobacterium tuberculosis in mice. *Infection and Immunity*, 73(8), 4471–4477. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.8.4471-4477.2005>
- Da Silva, P. E. A., Von Groll, A., Martin, A., & Palomino, J. C. (2011). Efflux as a mechanism for drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 63(1), 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2011.00831.x>
- Daniel, J., Abraham, L., Martin, A., Pablo, X., & Reyes, S. (2018). Rv2477c is an antibiotic-sensitive manganese-dependent ABC-F ATPase in Mycobacterium tuberculosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 495(1), 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.10.168>
- Degiacomi, G., Benjak, A., Madacki, J., Boldrin, F., Provvedi, R., Palù, G., Kordulakova, J., Cole, S. T., & Manganelli, R. (2017). Essentiality of *mmpL3* and impact of its silencing on Mycobacterium tuberculosis gene expression. *Scientific Reports*, 7, 43495. <https://doi.org/10.1038/srep43495>
- Domenech, P., Reed, M. B., & Barry, C. E. 3rd. (2005). Contribution of the Mycobacterium tuberculosis MmpL protein family to virulence and drug resistance. *Infection and Immunity*, 73(6), 3492–3501. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.6.3492-3501.2005>
- Dookie, N., Rambaran, S., Padayatchi, N., Mahomed, S., & Naidoo, K. (2018). Evolution of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: A review on the molecular determinants of resistance and implications for personalized care. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(5), 1138–1151. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx506>
- Drew, D., North, R. A., Nagarathinam, K., & Tanabe, M. (2021). Structures and General Transport Mechanisms by the Major Facilitator Superfamily (MFS). *Chemical Reviews*, 121(9), 5289–5335. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00983>

- Farrow, M. F., & Rubin, E. J. (2008). Function of a mycobacterial major facilitator superfamily pump requires a membrane-associated lipoprotein. *Journal of Bacteriology*, 190(5), 1783–1791. <https://doi.org/10.1128/JB.01046-07>
- Fonseca, J. D., Knight, G. M., & McHugh, T. D. (2015). The complex evolution of antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *International Journal of Infectious Diseases*, 32, 94–100. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2015.01.014>
- Forrest, L. R., Krämer, R., & Ziegler, C. (2011). The structural basis of secondary active transport mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1807(2), 167–188. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.10.014>
- Guo, H., Seet, Q., Denkin, S., Parsons, L., & Zhang, Y. (2006). Molecular characterization of isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from the USA. *Journal of Medical Microbiology*, 55(Pt 11), 1527–1531. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46718-0>
- Gupta, A. K., Reddy, V. P., Lavania, M., Chauhan, D. S., Venkatesan, K., Sharma, V. D., Tyagi, A. K., & Katoch, V. M. (2010). *jefA* (Rv2459), a drug efflux gene in *Mycobacterium tuberculosis* confers resistance to isoniazid & ethambutol. *The Indian journal of medical research*, 132, 176–188.
- Hao, P., Shi-Liang, Z., Ju, L., Ya-Xin, D., Biao, H., Xu, W., Min-Tao, H., Shou-Gang, K., & Ke, W. (2011). The role of ABC efflux pump, Rv1456c-Rv1457c-Rv1458c, from *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in China. *Folia Microbiologica*, 56(6), 549–553. <https://doi.org/10.1007/s12223-011-0080-7>
- Jaiswal, I., Jain, A., Verma, S. K., Singh, P., Kant, S., & Singh, M. (2017). Effect of efflux pump inhibitors on the susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid. *Lung India : Official Organ of Indian Chest Society*, 34(6), 499–505. <https://doi.org/10.4103/0970-2113.217567>
- Kanji, A., Hasan, R., & Hasan, Z. (2019). Efflux pump as alternate mechanism for drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *The Indian Journal of Tuberculosis*, 66(1), 20–25. <https://doi.org/10.1016/j.ijtb.2018.07.008>
- Kateete, D. P., Kamulegeya, R., Kigozi, E., Katabazi, F. A., Lukoye, D., Sebit, S. I., Abdi, H., Arube, P., Kasule, G. W., Musisi, K., Dlamini, M. G., Khumalo, D., & Joloba, M. L. (2019). Frequency and patterns of second-line resistance conferring mutations among MDR-TB isolates resistant to a second-line drug from eSwatini, Somalia and Uganda (2014-2016). *BMC pulmonary medicine*, 19(1), 124. <https://doi.org/10.1186/s12890-019-0891-x>
- Kozikowski, A. P., Onajole, O. K., Stec, J., Dupont, C., Viljoen, A., Richard, M., Chaira, T., Lun, S., Bishai, W., Raj, V. S., Ordway, D., & Kremer, L. (2017). Targeting Mycolic Acid Transport by Indole-2-carboxamides for the Treatment of *Mycobacterium abscessus* Infections. *Journal of Medicinal Chemistry*, 60(13), 5876–5888. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00582>
- Kumari, R., Banerjee, T., & Anupurba, S. (2018). Molecular detection of drug resistance to ofloxacin and kanamycin in *Mycobacterium tuberculosis* by using multiplex allele-specific PCR. *Journal of Infection and Public Health*, 11(1), 54–58. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2017.03.007>

- Lahiri, N., Shah, R. R., Layre, E., Young, D., Ford, C., Murray, M. B., Fortune, S. M., & Moody, D. B. (2016). Rifampin Resistance Mutations Are Associated with Broad Chemical Remodeling of *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 291(27), 14248–14256. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.716704>
- Li, G., Zhang, J., Guo, Q., Jiang, Y., Wei, J., Zhao, L., Zhao, X., Lu, J., & Wan, K. (2015). Efflux pump gene expression in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *PloS One*, 10(2), e0119013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119013>
- Li, P., Gu, Y., Li, J., Xie, L., Li, X., & Xie, J. (2017). *Mycobacterium tuberculosis* Major Facilitator Superfamily Transporters. *The Journal of Membrane Biology*, 250(6), 573–585. <https://doi.org/10.1007/s00232-017-9982-x>
- Li, X., Li, P., Ruan, C., Xie, L. X., Gu, Y., Li, J., Yi, Q., Lv, X., & Xie, J. (2019). *Mycobacterium tuberculosis* Rv0191 is an efflux pump of major facilitator superfamily transporter regulated by Rv1353c. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 667, 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.04.010>
- Liu, J., Takiff, H. E., & Nikaido, H. (1996). Active efflux of fluoroquinolones in *Mycobacterium smegmatis* mediated by LfrA, a multidrug efflux pump. *Journal of bacteriology*, 178(13), 3791–3795. <https://doi.org/10.1128/jb.178.13.3791-3795.1996>
- Locher, K. P. (2016). Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters. *Nature Structural & Molecular Biology*, 23(6), 487–493. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3216>
- Ma, S., Huang, Y., Xie, F., Gong, Z., Zhang, Y., Stojkoska, A., & Xie, J. (2020). Transport mechanism of *Mycobacterium tuberculosis* MmpL/S family proteins and implications in pharmaceutical targeting. *Biological Chemistry*, 401(3), 331–348. <https://doi.org/10.1515/hsz-2019-0326>
- Machado, D., Coelho, T. S., Perdigão, J., Pereira, C., Couto, I., Portugal, I., Maschmann, R. D. A., Ramos, D. F., von Groll, A., Rossetti, M. L. R., Silva, P. A., & Viveiros, M. (2017). Interplay between Mutations and Efflux in Drug Resistant Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Frontiers in Microbiology*, 8, 711. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00711>
- Manjelienskaia, J., Erck, D., Piracha, S., & Schragar, L. (2016). Drug-resistant TB: deadly, costly and in need of a vaccine. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 110(3), 186–191. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trw006>
- Melly, G., & Purdy, G. E. (2019). MmpL Proteins in Physiology and Pathogenesis of *M. tuberculosis*. *Microorganisms*, 7(3). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7030070>
- Oswald, C., Holland, I. B., & Schmitt, L. (2006). The motor domains of ABC-transporters. What can structures tell us? *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 372(6), 385–399. <https://doi.org/10.1007/s00210-005-0031-4>
- Oudghiri, A., Karimi, H., Chetioui, F., Zakham, F., Bourkadi, J. E., Elmessaoudi, M. D., Laglaoui, A., Chaoui, I., & El Mzibri, M. (2018). Molecular characterization of

- mutations associated with resistance to second-line tuberculosis drug among multidrug-resistant tuberculosis patients from high prevalence tuberculosis city in Morocco. *BMC infectious diseases*, 18(1), 98. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3009-9>
- Palomino, J. C., & Martin, A. (2014). Drug Resistance Mechanisms in Mycobacterium tuberculosis. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 3(3), 317–340. <https://doi.org/10.3390/antibiotics3030317>
- Pasca, M. R., Guglielame, P., Arcesi, F., Bellinzoni, M., Rossi, E. De, & Riccardi, G. (2004). Rv2686c-Rv2687c-Rv2688c, an ABC Fluoroquinolone Efflux Pump in Mycobacterium tuberculosis. 48(8), 3175–3178. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.8.3175>
- Pasqua, M., Grossi, M., Zennaro, A., Fanelli, G., Micheli, G., Barras, F., Colonna, B., & Prosseda, G. (2019). The Varied Role of Efflux Pumps of the MFS Family in the Interplay of Bacteria with Animal and Plant Cells. *Microorganisms*, 7(9), 285. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7090285>
- Quistgaard, E. M., Löw, C., Guettou, F., & Nordlund, P. (2016). Understanding transport by the major facilitator superfamily (MFS): structures pave the way. In *Nature reviews. Molecular cell biology* (Vol. 17, Issue 2, pp. 123–132). <https://doi.org/10.1038/nrm.2015.25>
- Ramón-García, S., Martín, C., Thompson, C. J., & Ainsa, J. A. (2009). Role of the Mycobacterium tuberculosis P55 efflux pump in intrinsic drug resistance, oxidative stress responses, and growth. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(9), 3675–3682. <https://doi.org/10.1128/AAC.00550-09>
- Remm, S., Earp, J. C., Dick, T., Dartois, V., & Seeger, M. A. (2022). Critical discussion on drug efflux in Mycobacterium tuberculosis. *FEMS Microbiology Reviews*, 46(1). <https://doi.org/10.1093/femsre/fuab050>
- Rodrigues, L., Machado, D., Couto, I., Amaral, L., & Viveiros, M. (2012). Contribution of efflux activity to isoniazid resistance in the Mycobacterium tuberculosis complex. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 12(4), 695–700. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.08.009>
- Shrivastava, K., Garima, K., Narang, A., Bhattacharyya, K., Vishnoi, E., Singh, R. K., Chaudhry, A., Prasad, R., Bose, M., & Varma-Basil, M. (2017). Rv1458c: a new diagnostic marker for identification of Mycobacterium tuberculosis complex in a novel duplex PCR assay. *Journal of Medical Microbiology*, 66(3), 371–376. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000440>
- Singh, R., Dwivedi, S. P., Gaharwar, U. S., Meena, R., Rajamani, P., & Prasad, T. (2020). Recent updates on drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Applied Microbiology*, 128(6), 1547–1567. <https://doi.org/10.1111/jam.14478>
- Sowajassatakul, A., Prammananan, T., Chaiprasert, A., & Phunpruch, S. (2018). Overexpression of eis without a mutation in promoter region of amikacin- and kanamycin-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical strain. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 17(1), 33. <https://doi.org/10.1186/s12941-018->

0285-6

- Spivey, V. L., Molle, V., Whalan, R. H., Rodgers, A., Leiba, J., Stach, L., Walker, K. B., Smerdon, S. J., & Buxton, R. S. (2011). Forkhead-associated (FHA) domain containing ABC transporter Rv1747 is positively regulated by Ser/Thr phosphorylation in *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*(29), 26198–26209. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.246132>
- Srivastava, S., Pasipanodya, J. G., Meek, C., Leff, R., & Gumbo, T. (2011). Multidrug-resistant tuberculosis not due to noncompliance but to between-patient pharmacokinetic variability. *The Journal of Infectious Diseases*, *204*(12), 1951–1959. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir658>
- Su, C.-C., Klenotic, P. A., Bolla, J. R., Purdy, G. E., Robinson, C. V., & Yu, E. W. (2019). MmpL3 is a lipid transporter that binds trehalose monomycolate and phosphatidylethanolamine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *116*(23), 11241–11246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1901346116>
- Tao, J., Han, J., Wu, H., Hu, X., Deng, J., Fleming, J., Maxwell, A., Bi, L., & Mi, K. (2013). *Mycobacterium* fluoroquinolone resistance protein B, a novel small GTPase, is involved in the regulation of DNA gyrase and drug resistance. *Nucleic Acids Research*, *41*(4), 2370–2381. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1351>
- Te Brake, L. H. M., de Knecht, G. J., de Steenwinkel, J. E., van Dam, T. J. P., Burger, D. M., Russel, F. G. M., van Crevel, R., Koenderink, J. B., & Aarnoutse, R. E. (2018). The Role of Efflux Pumps in Tuberculosis Treatment and Their Promise as a Target in Drug Development: Unraveling the Black Box. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *58*, 271–291. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010617-052438>
- Tsodikov, O. V., Green, K. D., & Garneau-Tsodikova, S. (2014). A random sequential mechanism of aminoglycoside acetylation by *Mycobacterium tuberculosis* Eis protein. *PloS One*, *9*(4), e92370. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092370>
- WHO. (2016). Global Tuberculosis Report 2016. Cdc 2016, (Global TB Report 2016). [https://doi.org/ISBN 978 92 4 156539 4](https://doi.org/ISBN%20978%2092%204%20156539%204)
- Wang, K., Pei, H., Huang, B., Zhu, X., Zhang, J., Zhou, B., Zhu, L., Zhang, Y., & Zhou, F.-F. (2013). The expression of ABC efflux pump, Rv1217c-Rv1218c, and its association with multidrug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in China. *Current Microbiology*, *66*(3), 222–226. <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0215-3>
- Willers, C., Wentzel, J. F., du Plessis, L. H., Gouws, C., & Hamman, J. H. (2017). Efflux as a mechanism of antimicrobial drug resistance in clinical relevant microorganisms: the role of efflux inhibitors. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, *21*(1), 23–36. <https://doi.org/10.1080/14728222.2017.1265105>
- Xiong, J., Feng, J., Yuan, D., Zhou, J., & Miao, W. (2015). Tracing the structural evolution of eukaryotic ATP binding cassette transporter superfamily. *Scientific reports*, *5*, 16724. <https://doi.org/10.1038/srep16724>
- Xu, Z., Meshcheryakov, V. A., Poce, G., & Chng, S.-S. (2017). MmpL3 is the flippase for mycolic acids in mycobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*

- Sciences of the United States of America*, 114(30), 7993–7998.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1700062114>
- Yan, N. (2015). Structural Biology of the Major Facilitator Superfamily Transporters. *Annual Review of Biophysics*, 44, 257–283. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-060414-033901>
- Zaubrecher, M. A., Sikes, R. D., Jr, Metchock, B., Shinnick, T. M., & Posey, J. E. (2009). Overexpression of the chromosomally encoded aminoglycoside acetyltransferase eis confers kanamycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(47), 20004–20009.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0907925106>
- Zhang, B., Li, J., Yang, X., Wu, L., Zhang, J., Yang, Y., Zhao, Y., Zhang, L., Yang, X., Yang, X., Cheng, X., Liu, Z., Jiang, B., Jiang, H., Guddat, L. W., Yang, H., & Rao, Z. (2019). Crystal Structures of Membrane Transporter MmpL3, an Anti-TB Drug Target. *Cell*, 176(3), 636-648.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.003>
- Zhang, X. C., Zhao, Y., Heng, J., & Jiang, D. (2015). Energy coupling mechanisms of MFS transporters. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 24(10), 1560–1579. <https://doi.org/10.1002/pro.2759>
- Zhang, Y., Zhang, J., Cui, P., Zhang, Y., & Zhang, W. (2017). Identification of Novel Efflux Proteins Rv0191, Rv3756c, Rv3008, and Rv1667c Involved in Pyrazinamide Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(8). <https://doi.org/10.1128/AAC.00940-17>